

UJI SEROLOGI ISOLAT *BACILLUS THURINGIENSIS* DAN PATOGENISITASNYA TERHADAP JENTIK NYAMUK VEKTOR¹

Blondine Ch.P.^{*}, Widyastuti U.^{*}, Widiarti^{*}, Sukarno^{*} dan Subiantoro^{*}

ABSTRACT

SEROLOGY TEST OF *BACILLUS THURINGIENSIS* ISOLATE AND ITS PATOGENICITY AGAINST MOSQUITO LARVAE VECTOR

Serology test study of 20 Bacillus thuringiensis bacteria isolates and its pathogenicity against vector mosquito larvae last instar III, on samples from various soil habitate was done in Salatiga municipal, Semarang regency, Purworejo regency and East Flores regency. The method used in this study (to determine Bacillus thuringiensis isolate serotype) was based on H-antigen (flagela) which is used as a movement organ of the bacteria. The twenty Bacillus thuringiensis isolates which were tested, can be grouped to 11 serotype (serotype H-3, 14, 43, 10, 8, 24, 11, 6, 23, 28, 13 and 11). H-14 serotype is the dominant serotype (3 isolate) followed by H-3, 43, 10 and 23 serotype are 2 isolate respectively and H-8, 24, 11, 6, 28 and 13 serotype are 1 isolate respectively. The pathogenicity test of 3 Bacillus thuringiensis isolate H-14 serotype against Aedes aegypti and Culex quinquefasciatus mosquito larvae, showed that 3 isolates (100%) has pathogenecity at 82.7% - 94.7% and 64.0% - 93.3% for 24 hours of exposure respectively. In 48 hours of exposure, using the same test, results showed that 3 isolates (100%) have a pathogenicity at 84.0% - 98.7% and 81.3% - 96.0% respectively.

PENDAHULUAN

Pengendalian serangga (seperti nyamuk), yang sering mengganggu manusia, pada saat ini banyak dilakukan secara hayati yaitu dengan memanfaatkan musuh alami. Pengendalian serangga dengan cara ini dipandang aman, karena tidak menimbulkan dampak negatif pada manusia, organisme lain yang bukan sasaran, kerusakan lingkungan dan resistensi nyamuk¹⁾.

Salah satu spesies bakteri sebagai musuh alami yang banyak dikembangkan untuk pengendalian hayati serangga/nyamuk adalah *Bacillus thuringiensis*. Bakteri ini dapat memproduksi kristal

protein toksin di dalam sel bersama-sama dengan spora pada waktu sel mengalami sporulasi¹⁾. Kristal protein toksin memegang peranan penting karena aktivitasnya sebagai insektisida²⁾. Bakteri ini juga mempunyai patogenesis tinggi terhadap jentik nyamuk dan jentik lalat hitam³⁾.

Ditemukan 20 isolat *B. thuringiensis* yang berhasil diisolasi dari berbagai habitat tanah di laboratorium jasad hayati Stasiun Penelitian Vektor Penyakit (SPVP). Oleh karena itu untuk membedakan dan mengklasifikasikan isolat-isolat teraebut, maka perlu dilakukan identifikasi dari isolat-isolat ini yaitu dengan menetapkan serotipenya.

¹ Disajikan pada Seminar Hasil Penelitian Rutin Stasiun Penelitian Vektor Penyakit.

^{*} Stasiun Penelitian Vektor Penyakit, Puslit Ekologi Kesehatan, Badan Litbangkes, Depkes RI.

Tujuan penelitian ini adalah menguji serologi isolat *B. thuringiensis* dan patogenisitasnya terhadap jentik nyamuk vektor.

METODOLOGI

Bahan Penelitian

Dua puluh isolat *B. thuringiensis* yang diisolasi dari berbagai habitat tanah di Kotamadya Salatiga, Kabupaten Semarang, Kabupaten Purworejo dan Kabupaten Flores Timur menurut metode Chilcott dan Wigley (1988), akan ditetapkan serotipenya. *Strain* standar yang digunakan adalah 50 subspecies *B. thuringiensis* yang diperoleh dari Institut Pasteur Perancis, Bacillus Genetic Stock Center – The Ohio State University – USA, USDA – Illinois – USA, dan koleksi IPB. Semua biakan ini disimpan dalam agar nutrisi miring pada suhu 4°C. Antisera standar yang digunakan sebanyak 50 antisera-H yang diperoleh dari Institut Pasteur Perancis. Jentik nyamuk vektor yang digunakan adalah *Aedes aegypti* dan *Culex quinquefasciatus* masing-masing instar III akhir, hasil kolonisasi laboratorium. Penelitian ini dilakukan di Unit Penelitian Bioteknologi Perkebunan, Bogor.

Pelaksanaan Penelitian

1. Persiapan antigen standar

Yang dikenali dalam penetapan serotipe adalah antigen flagelum, maka diperlukan bakteri dengan motilitas yang tinggi. Oleh karena itu motilitas bakteri perlu diaktifkan dengan cara menumbuhkan isolat standar dan isolat hasil dalam tabung Craigie⁵⁾, sebagai berikut:

Isolat standar dalam agar miring yang diinkubasi pada temperatur kamar selama 1 hari, diambil sebanyak 1 ose dan diinokulasikan ke dalam media lunak (0,3% *nutrien broth* + 0,5% ekstrak ragi) sebanyak 7,5 ml, dan dikocok selama 5 jam. Kemudian diambil 1% inokulum (75 ul) dengan menggunakan pipet Gilson dipindahkan ke dalam media lunak yang baru dan dikocok lagi selama 5 jam. Inokulum yang diperoleh diambil dengan menggunakan pipet Pasteur yang panjangnya 23 cm, diinokulasikan pada permukaan media dalam tabung kecil yaitu tabung Craigie, yang berisi 0,3% agar nutrisi + 0,5% ekstrak ragi sebanyak 6 ml sampai kira-kira 1 cm di bawah permukaan tabung kecil kemudian diinkubasikan pada suhu kamar selama 2 hari. Bakteri yang bermigrasi bergerak ke dasar tabung. dapat terlihat dengan bertambahnya cincin turbiditas pada medium. Prosedur ini diulangi lagi, pada tabung Craigie yang steril (berisi 0,3% agar nutrisi lunak + 0,5% ekstrak ragi) sebanyak 4 ml, satu sampai 3 kali. Apabila migrasi mencapai 14-16 jam maka bakteri ini cukup baik untuk uji aglutinasi. Kemudian diambil sebanyak 10 tetes dan diinokulasikan ke dalam gelas Erlenmeyer yang berisi 0,3% *nutrien broth* dan 0,5% ekstrak ragi sebanyak 50 ml, dan dikocok selama 5 jam. Suspensi bakteri ini, dibandingkan kekeruhannya di antara larutan Mc Farlan 3 dan Mc Farlan 4. Suspensi bakteri yang diperoleh, selanjutnya disimpan pada suhu 4°C, setelah ditambah formalin hingga konsentrasi mencapai 0,5%. Persiapan antigen 20 isolat *B. thuringiensis* hasil isolasi, dilakukan dengan cara yang sama.

2. Pengenceran antiserum

Sebanyak 50 antisera-H standar dalam ampul, dibuka dengan cara dipotong ujungnya dengan menggunakan

gergaji. Kemudian dipindahkan ke dalam tabung Eppendorf yang bervolume 1,5 ml. Kemudian dibuat pengenceran berkelipatan 2 dari masing-masing antisera, dimulai dari pengenceran 100, 200, 400, 800, 1.600, sampai dengan 51.200, yang volumenya sebanyak 1,5 ml.

3. Penentuan titer

Menggunakan pipet Gilson, diambil antigen-H isolat standar dan isolat hasil isolasi masing-masing 100 ul dan diletakkan pada *micro well*. Kemudian pada masing-masing antigen, ditambah 100 ul antisera (diambil dari pengenceran 100, 200, 400 dan seterusnya sampai pengenceran 51.200) yang homolog

dengan antigen standar. Sebagai kontrol adalah 100 ul NaCl 0,85% ditambah 100 ul antisera. Campuran yang diperoleh, diinkubasi pada suhu 55°C selama 2 jam. Diamati gumpalan yang terjadi. Nilai titer adalah nilai pengenceran tertinggi yang masih menunjukkan terjadinya aglutinasi.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Dari 18 sampel tanah yang diambil dari berbagai habitat tanah di 7 lokasi (Kotamadya Salatiga, Kabupaten Semarang, Kabupaten Purworejo dan Kabupaten Flores Timur) setelah diisolasi menurut metode Chilcott dan Wigley (1988), diperoleh 20 isolat *Bacillus thuringiensis* (Tabel 1).

Tabel 1. Hasil Isolasi *Bacillus thuringiensis* dari Berbagai Habitat Tanah di 7 Lokasi.

No.	Lokasi	Habitat tanah	Jumlah sampel Tanah/isolat	Hasil isolasi Positif <i>B. thuringiensis</i>
1.	Pabelan	Sawah	3/3	+
		Lobang pohon rambutan	1/1	+
		Lobang pohon beringin	3/3	+
2.	Legoksari	Sawah	1/1	+
3.	Pasir gedangan	Bawah pohon kelengkeng	1/2	+
4.	Konga	Lobang pohon kelapa	1/1	+
5.	Candi	Lobang pohon duku	1/1	+
6.	Kesongo	Lobang pohon kelengkeng	3/3	+
7.	Imam Bonjol	Lobang pohon kelengkeng	4/4	+
Total			18/20	+

Dua puluh isolat *B. thuringiensis* yang ditemukan, diuji serologi untuk mengetahui serotipenya. Pada saat ini telah dikenal 58 jenis isolat standar (Lecadet, 1995 dalam Taniwiryono)⁶. Yang digunakan dalam penelitian ini sebanyak 50 jenis isolat standar dan 50 jenis antisera standar. Sedangkan yang

tidak digunakan adalah 8 jenis antisera yaitu antisera-berserotipe H-5, 8, 20, 21, 34 dan 39.

Hasil uji serologi 20 isolat *B. thuringiensis* menurut habitat disajikan pada Tabel 2. Hasil uji serologi 20 isolat *B. thuringiensis* hasil isolasi, dapat

ditetapkan serotipenya, yaitu terdapat 11 serotipe H (serotipe H-3, 14, 43, 10, 8, 24, 11, 23, 28 dan 13) (Tabel 2). Tiga isolat masing-masing berasal dari tanah sawah, tanah lobang pohon kelapa dan tanah lobang pohon kelengkeng tidak ditemukan serotipenya, berdasarkan antisera yang

digunakan yaitu 50 jenis antisera standar. Kemungkinan 3 isolat *B. thuringiensis* tersebut termasuk dalam 8 jenis antisera standar yang tidak digunakan. Hal ini perlu diteliti lebih lanjut yaitu dengan mengkonfirmasi isolat-isolat tersebut di Institut Pasteur Paris.

Tabel 2. Hasil Isolasi *Bacillus thuringiensis* dari Berbagai Habitat Tanah di 7 Lokasi.

Habitat tanah							Jumlah Isolat <i>B. thuringiensis</i>	Serotipe -H	Serovar
S	LPR	LPB	BPK LNG	LPK	LMD	LPK LNG			
1	-	1	-	-	-	-	2	3	<i>alesti, kurstaki, sumiyoshiensis, fukuokaensis</i>
1	1	-	1	-	-	-	3	14	<i>israelensis</i>
1	-	-	-	-	-	1	2	43	<i>guiyangiensis</i>
1	-	-	-	-	-	1	2	10	<i>darmstadiensis, londrina</i>
-	-	1	-	-	-	-	1	8	<i>morrisoni, ostrinae, nigeriensis</i>
-	-	1	-	-	-	-	1	24	<i>neoleonensis, novosibirsk</i>
-	-	-	1	-	-	-	1	11	<i>toumanoffi, kyushuensis</i>
-	-	-	-	-	1	-	1	6	<i>entomocidus</i>
-	-	-	-	-	-	2	2	23	<i>japonensis</i>
-	-	-	-	-	-	1	1	28	<i>monterrey, jegathesan</i>
-	-	-	-	-	-	1	1	13	<i>pakistani</i>
1	-	-	-	1	-	1	3	*	-
5	1	3	2	1	1	7	20	11	

Keterangan:

- * = tidak dapat ditentukan berdasarkan antiserum standar yang digunakan
- S = sawah
- LPR = lobang pohon rambutan
- LPB = lobang pohon beringin
- BPKLNG = bawah pohon kelengkeng
- LPK = lobang pohon kelapa
- LPD = lobang pohon duku
- LPKLNG = lobang pohon kelengkeng

Serotipe H-14 merupakan serotipe yang dominan, sebab penyebarannya lebih luas dibandingkan dengan serotipe yang lain. Penyebaran serotipe H-14 di tanah sawah, tanah lobang pohon rambutan dan tanah bawah pohon kelengkeng. Sedang-

kan penyebaran serotipe lain hanya di satu atau dua habitat saja.

Menurut habitat tanah, maka tanah yang berada pada lobang pohon kelengkeng, mengandung 6 serotipe H, diikuti

tanah sawah (4 serotipe H), tanah lobang pohon beringin (3 serotipe H), tanah bawah pohon kelengkeng (2 serotipe H), tanah lobang pohon rambutan dan tanah lobang pohon duku, masing-masing 1 serotipe H. Hal ini dimungkinkan karena sampel tanah yang diambil dari lobang pohon kelengkeng yang sudah tua umurnya (kira-kira 40-60 tahun) sehingga

banyak mengandung bahan-bahan organik (komunikasi pribadi dengan Dr. Pillai) dan sampel tanah yang diambil lebih banyak.

Hasil uji patogenisitas 11 serotipe-H yang ditemukan terhadap jentik nyamuk *Ae. aegypti* dan *Cx. quinquefasciatus* instar III selama 24 dan 48 jam pengujian disajikan pada Tabel 3.

Tabel 3. Hasil Uji Patogenisitas 11 Serotipe-H yang Ditemukan Terhadap Jentik Nyamuk *Aedes aegypti* dan *Culex quinquefasciatus* Instar III Selama 24 Jam dan 48 Jam Pengujian.

Serotipe -H	Serovar	Jumlah isolat <i>B. thuringiensis</i>	Sandi isolat	Persentase kematian *			
				<i>Ae. aegypti</i>		<i>Cx. quinquefasciatus</i>	
				24 J	48 J	24 J	48 J
3	<i>alesti, kurstaki, sumiyoshiensis, fukuokaensis</i>	2	1A	33,3	36,0	45,3	49,3
			28	40,0	44,0	33,3	45,3
14	<i>israelensis</i>	3	14	94,7	98,7	93,3	96,0
			1B	89,3	98,7	69,3	89,3
			4	82,7	84,0	64,0	81,3
43	<i>guiyangiensis</i>	2	8	100,0	100,0	94,7	100,0
			12	86,7	98,7	74,7	88,0
10	<i>darmstadiensis, londrina</i>	2	9	94,7	100,0	100,0	100,0
			13	25,3	36,0	18,7	33,3
8	<i>morrisoni, ostrinae, nigeriensis</i>	1	27	40,0	54,7	84,0	92,0
24	<i>neoleonensis, novosibirsk</i>	1	29	24,0	36,0	44,0	49,3
11	<i>toumanoffi, kyushuensis</i>	1	5	18,7	21,3	50,7	68,0
6	<i>entomocidus</i>	1	10	81,3	89,3	77,3	82,7
23	<i>japonensis</i>	2	21	98,7	100,0	100,0	100,0
			19	88,0	100,0	100,0	100,0
28	<i>monterrey, jegathesan</i>	1	16	92,0	100,0	45,0	64,0
13	<i>pakistani</i>	1	18	76,0	85,3	44,0	61,3

Keterangan: * rata-rata 3x ulangan.

Dalam penelitian ini, isolat *B. thuringiensis* yang berserotipe H-14, merupakan isolat yang lebih dominan sebab penyebarannya luas dan telah diketahui mempunyai patogenisitas tinggi terhadap jentik nyamuk dibandingkan

dengan serotipe lain yang lebih peka terhadap golongan Lepidoptera³⁾. Uji patogenisitas 3 isolat *B. thuringiensis* serotipe H-14 terhadap jentik nyamuk *Ae. aegypti* dan *Cx. quinquefasciatus* berturut-turut diperoleh 3 isolat (100%) yang

mempunyai patogenisitas sebesar 82,7% - 94,7% dan 64,0% - 93,3% selama 24 jam pengujian. Pada 48 jam pengujian, dengan uji serupa berturut-turut diperoleh 3 isolat (100%) yang mempunyai patogenisitas sebesar 84,0% - 98,7% dan 81,3% - 96,0%.

Michio Ohba *et al* (1980)⁷⁾ melaporkan bahwa serotipe H-3 dan 10, toksik pada larva Lepidoptera misalnya larva lalat (*Musca domestica*), sedangkan serotipe H-11 (*B. thuringiensis* subsp *kyushuensis*) selain toksik terhadap larva Lepidoptera juga toksik pada larva Diptera misalnya larva nyamuk *Cx. tritaeniorhynchus*. Oleh Leodegario E.P. *et al*, 1979⁸⁾ melaporkan bahwa serotipe H-10 (*B. thuringiensis* subsp *darmstadiensis*) toksik terhadap larva Diptera misalnya larva nyamuk *Ae. aegypti*, *Cx. quinquefasciatus* dan *Cx. molestus*. Pada Tabel 3 terlihat serotipe H-10 dengan sandi isolat 9, mempunyai patogenisitas tinggi terhadap jentik nyamuk *Ae. aegypti* dan *Cx. quinquefasciatus*, masing-masing sebesar 94,5% dan 100% selama 24 jam pengujian. Pada 48 jam pengujian, patogenisitas terhadap jentik nyamuk *Ae. aegypti* dan *Cx. quinquefasciatus* masing-masing sebesar 100%. Serotipe H-11 dengan sandi isolat 5, mempunyai patogenisitas rendah terhadap jentik nyamuk *Ae. aegypti* yaitu 18,7% (24 jam pengujian) dan 21,3% (48 jam pengujian). Akan tetapi serotipe ini mempunyai patogenisitas tinggi terhadap jentik nyamuk *Cx. quinquefasciatus* yaitu 50,7% (24 jam pengujian), dan 68,0% (48 jam pengujian). Serotipe H-3 mempunyai patogenisitas rendah terhadap jentik nyamuk *Ae. aegypti* dan *Cx. quinquefasciatus*, masing-masing sebesar 33,3% - 40,0% dan 33,3% - 45,3% selama 24 jam pengujian. Pada 48 jam pengujian,

patogenisitas terhadap jentik nyamuk *Ae. aegypti* dan *Cx. quinquefasciatus*, masing-masing sebesar 36,0% - 40,0% dan 45,3% - 49,3%.

Serotipe H-8 (*B. thuringiensis* subsp *morrisoni*), serotipe H-6 (*B. thuringiensis* subsp *entomocidus*) dan serotipe H-24 (*B. thuringiensis* subsp *neoleonensis*) merupakan strain yang toksik terhadap golongan Lepidoptera^{9,10)}. Akan tetapi pada Tabel 3 terlihat serotipe H-8, 6 bersama-sama dengan serotipe H-43, 23, 28 dan 13, masing-masing mempunyai patogenisitas tinggi terhadap jentik nyamuk *Ae. aegypti* dan *Cx. quinquefasciatus*. Seperti dikemukakan oleh Geoffrey *et al* (1995)¹¹⁾ bahwa strain *B. thuringiensis* subsp *aizawi* (serotipe H-7) yang toksik terhadap golongan Lepidoptera, ternyata toksik pula terhadap golongan Diptera misalnya *Ae. aegypti*, *Cx. quinquefasciatus*, dan *Anopheles gambiae* setelah dilakukan teknik reaksi rantai polimerasi (PCR). Dengan melihat hasil ini, maka perlu dilakukan penelitian lebih lanjut dari serotipe-serotipe ini, (serotipe H-3, 43, 10, 8, 24, 11, 6, 23, 28 dan 11) misalnya dengan teknik reaksi rantai polimerasi (PCR). Tujuan PCR adalah menseleksi terdapat tidaknya urutan DNA (*Deoxyribo Nucleic Acid*) secara langsung sehingga dengan teknik ini gen yang bersifat tenang dapat terdeteksi¹²⁾.

Perbedaan serotipe dapat mempengaruhi daya bunuh dari isolat-isolat yang diperoleh. Seperti telah dikemukakan di muka bahwa serotipe *B. thuringiensis* H-14 menunjukkan patogenisitas tinggi terhadap jentik nyamuk, dibandingkan dengan serotipe lain yang lebih peka terhadap golongan Lepidoptera. Selain itu

jentik nyamuk yang berbeda mempunyai kebiasaan dan perilaku makan yang berbeda pula, dan adanya toksin di daerah makan jentik (*larval feeding zone*) dapat mempengaruhi efikasi berbagai isolat *B. thuringiensis*¹³⁾. Jentik nyamuk dan *Cx. quinquefasciatus* biasa mengambil makanannya di bawah permukaan air (*suspension feeders*)¹⁴⁾.

KESIMPULAN

Dua puluh isolat *B. thuringiensis* yang diuji serologinya, dapat dikelompokkan ke dalam 11 serotipe-H. Serotipe H-14 (3 isolat) adalah serotipe yang lebih dominan karena lebih luas penyebarannya, diikuti oleh serotipe H-3, 43, 10 dan 23, masing-masing 2 isolat dan serotipe H-8, 24, 11, 6, 28 dan 13, masing-masing 1 isolat *B. thuringiensis*.

Uji patogenisitas 3 isolat *B. thuringiensis* serotipe H-14 terhadap jentik nyamuk *Ae. aegypti* dan *Cx. quinquefasciatus*, berturut-turut diperoleh 3 isolat (100%) yang mempunyai patogenisitas sebesar 82,7% - 94,7% dan 64,0% - 93,3% selama 24 jam pengujian. Pada 48 jam pengujian, dengan uji serupa berturut-turut diperoleh 3 isolat (100%) yang mempunyai patogenisitas sebesar 84,0% - 98,7% dan 81,3% - 96,0%.

Serotipe H-3, 43, 10, 8, 24, 11, 6, 23, 28 dan 13, masing-masing mempunyai patogenisitas terhadap jentik nyamuk *Ae. aegypti* dan *Cx. quinquefasciatus* lebih besar atau kurang dari 50% akan dilakukan penelitian lebih lanjut dengan teknik reaksi rantai polimerasi (PCR) untuk mengetahui *gen cryp*-nya.

UCAPAN TERIMA KASIH

Dengan selesainya penelitian dan penulisan makalah ini, penulis menyampaikan rasa terima kasih kepada: Kepala Stasiun Penelitian Vektor Penyakit Salatiga, dan Ketua Kelompok Peneliti SPVP yang telah membina penelitian ini, memberikan komentar dan saran dari awal hingga selesainya makalah ini. Ucapan terima kasih juga kami sampaikan kepada Ir. Happy Widiastuti, MS staf Peneliti Unit Penelitian Bioteknologi Perkebunan Bogor, yang telah membantu pelaksanaan penelitian di laboratorium.

DAFTAR RUJUKAN

1. Drobniewski, F.A. (1994). The safety of *Bacillus* species as insect vector control agents. *J. Appl. Bacteriol.* 76:101-109.
2. Soesanto (1994). Prospek *Bacillus thuringiensis* dalam pengendalian hama. Kumpulan Makalah Seminar *Bacillus thuringiensis*. Komisi Pestisida Departemen Pertanian. Hal:1-4.
3. Aly, C. (1983). Feeding behavior of *Aedes vexans* larvae (Diptera; Culicidae) and its influence on the effectiveness of *Bacillus thuringiensis israelensis*. *Bull. Soc. Vector. Ecol.* 8(2):94-100.
4. Lee, H.L. (1988). Isolation and evaluation of two isolates of *Bacillus thuringiensis* for the control of mosquitoes of public health importance in Malaysia. *Mosq. Borne. Disease. Bull.* 5(3-4):39-47.
5. De Barjac, H. (1981). Identification of H-serotype of *Bacillus thuringiensis*. In *Microbial Control of Pest and Plant Diseases 1970-1980*. H.D. Burges (ed). Acad. Press. London.p.35-39.
6. Taniwiryono, D. dan H. Widiastuti (1996). Karakterisasi *Bacillus thuringiensis* yang menentukan efektivitasnya sebagai bioinsektisida bagi hama tanaman kakao. 8h.
7. Michio, O.; T. Achara; & A. Keio (1980). Production of Heat Stable Exotoxin by *Bacillus thuringiensis* and Related Bacteria. *Journal of invertebrate pathology.* 38:26-32.

8. Leodegario, E.P.; O. Michio & A. Keio (1979). The isolates of *Bacillus thuringiensis* serotype 10 with a highly preferential toxicity to mosquito larvae. *Journal of invertebrate pathology*. 36:180-186.
9. Hastowo, S.; B.W. Lay & M. Ohba (1992). Naturally occurring *Bacillus thuringiensis* in Indonesia Inter University Centre for Biotechnology, Institut Pertanian Bogor, Indonesia and Institute of Biological Control, Faculty of Agriculture, Kyushu University, Japan. *Journal of Applied Bacteriology*. 73:108-113.
10. Rodriguez, P.C.; L. Galan Wong; H. de Barjac; E. Roman Calderon; G.R. Tamez; & H. Dulmage (1990). *Bacillus thuringiensis* subspecies *neoleonensis* serotype H-24, a new subspecies which produces a triangular crystal. *Journal of Invertebrate Pathology*. 56:280-282.
11. Geoffrey, P.S.; D.M. Julie; J.B. Eileen; & J.E. David (1995). Mosquitocidal Activity of the CryIC delta endotoxin from *Bacillus thuringiensis* subsp *aizawai*. *Applied and environmental Microbiology*. 56:280-282.
12. Kalman, S.; K.L. Kiehne; J.L. Libs; & T. Yamamoto (1993). Cloning of a novel Cry-IC type gene from a stain of *Bacillus thuringiensis* subsp *galleriae*. *Appl. Environ. Microb.* 59(4):1131-1137.
13. Aly, C.; M.S. Mulla; Bo-zhao xu & W. Schnetter (1988). Rate of ingestion by mosquito larvae (Diptera, Culicidae) as a factor in the effectiveness of a bacterial stomach toxin. *J. Med. Ent.* 25(3):191-196.
14. Becker, N.; S. Djakaria; A. Kaiser; O. Zulhasril & H.W. Ludwig (1991). Efficacy of a new tablet formulations of an Asporogenous strain of *Bacillus thuringiensis israelensis* against larvae of *Aedes aegypti*. *Bull. Soc. Vector. Ecol.* 16(1):1-7.